



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/49, C07K 14/16, A61K 39/21, C12N 15/63		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/66046 (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1999 (23.12.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01409 (22) Date de dépôt international: 14 juin 1999 (14.06.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/07598 12 juin 1998 (12.06.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): BARBAN, Véronique [FR/FR]; 3, rue Gustave Nadaud, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataire: KERNEIS, Danièle; Pasteur Merieux Connaught, Direction de la Propriété Industrielle, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: HIV VIRUS MIMOTOPES (54) Titre: MIMOTOPES DU VIRUS HIV (57) Abstract <p>The invention concerns a peptide for therapeutic or prophylactic treatment of HIV infection, capable of reacting with an antibody specific of the HIV virus envelope and derived from a HIV positive patient belonging to the long term non-progressor group, comprising an amino acid sequence mimicking an antigen conformational epitope of said virus envelope without however corresponding to a continuous sequence of said antigen and capable of containing optionally one of the 11 amino acid sequences as specified in the description. The invention also concerns a peptide conjugate obtained by combining the peptide with a carrier molecule for reinforcing said peptide immunogenicity. The invention further concerns a recombinant vector comprising a functional expression cassette for expressing a polynucleotide coding for said peptide. The invention likewise concerns a therapeutic or prophylactic composition for HIV infection, in particular for vaccinal use, whereof the principle comprises said peptide, or as the case may be said peptide conjugate and/or a recombinant vector coding for said peptide. Finally the invention concerns the use of said peptide as reagent for diagnosing HIV infection and/or the proneness of subjects in contact with the virus for rapidly developing AIDS.</p> (57) Abrégé <p>Peptide pour le traitement thérapeutique ou prophylactique de l'infection à HIV, capable de réagir avec un anticorps spécifique de l'enveloppe du virus HIV et provenant d'un patient HIV positif appartenant au groupe des "long term non progressor", comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de l'enveloppe dudit virus sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène et pouvant contenir au choix l'une des 11 séquences en acides aminés telles que spécifiées dans l'invention. Conjugué du peptide selon l'invention résultant de l'association du peptide à une molécule porteuse pour renforcer l'immunogénicité dudit peptide. Vecteur recombinant comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un poly nucléotide codant pour un peptide selon l'invention. Composition thérapeutique ou prophylactique de l'infection à HIV, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe comprend un peptide selon l'invention, le cas échéant un conjugué de ce peptide et/ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide. Utilisation d'un peptide selon l'invention en tant que réactif pour le diagnostic de l'infection à HIV et/ou de la susceptibilité des sujets en contact avec le virus à développer rapidement un SIDA.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Mimotopes du Virus HIV

Objet de l'invention

La présente invention se rapporte au traitement et à la prévention du virus HIV et notamment à tout peptide mimant de nouveaux épitopes conformationnels d'antigènes de l'enveloppe du virus HIV et à tout polynucléotide intégré dans un vecteur permettant l'expression desdits peptides et leur utilisation à des fins thérapeutiques, prophylactiques, notamment vaccinales, et/ou diagnostiques.

Domaine de l'invention

Le HIV est un virus enveloppé à ARN et représente l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA, dont l'issue est fatale à terme, caractérisé par une destruction progressive du système immunitaire et le développement concomitant d'infections micro biologiques mettant souvent en cause des germes opportunistes.

La majorité des individus développent un syndrome d'immunodéficience acquise dans les 10 années qui suivent la contamination. En effet, les réactions immunitaires en réponse à l'infection sont très souvent inadaptées et notamment celles qui sont dirigées contre les protéines d'enveloppe en raison même de la très grande variabilité du virus résultant de sa grande capacité à se multiplier, à muter et à se recombiner (Bangham C.R.M et al 1997 Lancet 350:1617-1621). La très grande variabilité du virus HIV permet d'échapper au contrôle par le système immunitaire et favorise ainsi la dissémination du virus. Cependant, des études épidémiologiques récentes ont montré que certaines personnes infectées pouvaient contenir leur infection, sans manifestations cliniques apparentes et sans signes biologiques d'immunosuppression pendant des périodes de temps supérieures à 10 années (Pilgrim A.K et al., 1997, J. Infect. Dis. 176: 924-932). Le sérum de ces personnes encore appelées "long-term non progressors" révèle la présence d'anticorps neutralisants contre des isolats primaires de virus HIV (Pilgrim A.K et al., 1997, J. Infect. Dis. 176: 924-932).

L'enveloppe du virus HIV, issue du produit d'expression du gène Env (gène de l'enveloppe), est synthétisée tout d'abord sous la forme d'une glycoprotéine Gp160 qui se clive ensuite en deux glycoprotéines Gp 120 et Gp 41. On retrouve ces 3 protéines à la surface des cellules infectées par le HIV. De plus, la Gp 160 et la Gp 120 possèdent une affinité pour la molécule CD4 présente à la surface de certains lymphocytes T, molécule

CD4 qui sert de porte d'entrée du virus HIV vers l'intérieur de la cellule. Jusqu'à présent, très peu d'épitopes accessibles au système immunitaire ont été décrits sur l'enveloppe du virus HIV (Burton D.R , 1997 Proc.Natl. Acad. Sci. USA 94: 10018-10023).

5 Il existe donc un besoin dans la caractérisation de nouveaux épitopes de l'enveloppe du HIV.

Il existe aussi un besoin à identifier des épitopes de l'enveloppe qui soient inducteurs d'anticorps neutralisants, ou en d'autres termes qui soient capables de réduire
10 ou de supprimer la dissémination virale.

Il existe également un besoin d'identifier une composition pharmaceutique permettant de traiter efficacement ou de prévenir l'infection à virus HIV.

15 Enfin il existe aussi un besoin de développer des réactifs rentrant notamment dans la composition de kits immunologiques qui permettent de distinguer notamment parmi les personnes infectées celles qui sont le plus résistantes à l'infection ou "long-term non progressor" et de tester, par exemple l'efficacité de nouveaux vaccins par leur capacité à induire des anticorps neutralisants.

20

Résumé de l'invention

La présente invention vise à pallier ces besoins en identifiant de nouvelles structures peptidiques pour le traitement thérapeutique ou prophylactique de l'infection à virus HIV
25 à partir de l'utilisation d'une banque combinatoire d'anticorps provenant de patients HIV positif et appartenant au groupe des "long term non progressor". A cet effet, l'invention concerne toute structure peptidique capable de réagir avec un anticorps spécifique d'un antigène de l'enveloppe du HIV provenant, par exemple, d'une banque combinatoire d'anticorps obtenu à partir de lymphocytes de patients HIV positif et appartenant au
30 groupe des "long term non progressor", comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel de l'enveloppe dudit virus sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène.

La sélection de mimotopes au moyen d'anticorps recombinants provenant de
35 patients HIV positif et appartenant au groupe des "long term non progressor" présente

l'avantage d'identifier de nouveaux épitopes inducteurs d'anticorps neutralisants qui soient efficaces dans la protection contre des isolats primaires de virus HIV

5 La présente invention concerne également tout vecteur recombinant comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un polynucléotide codant pour un peptide répondant aux critères définis ci dessus.

10 La présente invention concerne aussi une composition thérapeutique ou prophylactique du virus HIV, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe actif comprend un peptide répondant aux critères définis ci dessus et/ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide.

Enfin la présente invention concerne aussi

- 15 - l'utilisation d'un peptide répondant aux critères définis ci dessus en tant que réactif pour le diagnostic du virus HIV permettant notamment d'identifier les sujets en contact avec le virus plus résistants à l'infection, ledit diagnostic comprenant l'évaluation, à partir d'un échantillon de sang, de la réponse humorale et/ou à médiation cellulaire spécifique de ce peptide.
- 20 - l'utilisation d'un peptide répondant aux critères définis ci dessus et/ou d'un vecteur recombinant codant pour ledit peptide pour la préparation d'une composition thérapeutique ou prophylactique destinée au traitement ou à la prévention de l'infection par le virus HIV.

25 Description de l'invention

Dans le contexte de la présente invention, différents termes employés sont ci-après définis:

30 "Par peptide" on entend une séquence d'au moins 6 acides aminés liés entre eux par une liaison peptidique obtenu par synthèse chimique ou par des techniques de recombinaison génétique, de préférence entre 6 et 100 acides aminés et notamment entre 20 et 80 acides aminés.

35 "Par antigène de l'enveloppe du HIV" on entend toute entité moléculaire qui se lie à

un anticorps spécifique de tout produit issu du gène env, comprenant notamment la gp 160 sous forme naturelle ou recombinante, ses dérivés constitués par la gp41 et la gp 120 pouvant également être sous forme naturelle ou recombinante et les produits issus de la combinaison desdites molécules.

5

"Par épitope conformationnel" on entend une structure tridimensionnelle qui permet son positionnement dans le site de liaison spécifique d'un anticorps, à la façon d'une clef dans une serrure, et qui est représentée par une séquence d'acides aminés qui ne correspond pas à une séquence continue en acides aminés de la protéine contre laquelle est dirigé cet anticorps. De préférence, cette séquence en acides aminés de l'épitope conformationnel n'est pas homologue à une séquence continue en acides aminés de la protéine naturelle ou recombinante, l'homologie étant définie par la combinaison de deux critères:

10

- le critère d'identité des acides aminés déterminé par le rapport entre le nombre d'acides aminés d'un peptide selon l'invention qui sont identiques à ceux d'une séquence de même taille portée par la protéine naturelle ou recombinante, et le nombre total d'acides aminés dudit peptide. De préférence l'identité en acides aminés ne dépassera pas de préférence 50%, voire 60% ou 70% ou 80% ou même 90%.

15

- Le critère d'enchaînement déterminé par le rapport entre le nombre d'acides aminés d'un peptide selon l'invention qui sont à la fois identiques et se trouvent à la même position d'enchaînement que ceux d'une séquence de même taille portée par la protéine naturelle ou recombinante, et le nombre total d'acides aminés dudit peptide. De préférence l'identité d'enchaînement ne dépassera pas 70 à 80%.

20

25

" Par long term non progressor" on entend des sujets HIV positifs caractérisés sur le plan clinique, en ce qu'ils ne développent de SIDA depuis qu'ils sont contaminés avec un recul d'au moins dix années, sur le plan biologique, en ce qu'ils ne montrent pas de signes d'immunosuppression avec notamment un taux de lymphocytes T CD4 supérieurs à 600/mm³ et enfin ne recevant pas de traitement antiviral particulier.

30

"Par mimotope" on entend un épitope qui mime la structure tridimensionnelle d'un autre épitope en se fixant sur le site de liaison spécifique du même anticorps

35

"Par CDR3" on entend la région hypervariable d'enchaînement en acides aminés de

la chaîne lourde et légère des immunoglobulines et qui se situe au niveau du site d'interaction spécifique avec l'épitope.

5 "Par conjugué" on entend l'association du peptide tel que défini dans l'invention à toute autre molécule, par des procédés physiques ou chimiques, ayant pour vocation d'induire ou de renforcer l'immunogénicité du peptide de départ.

10 "Par immunogénicité" on entend la capacité d'une entité moléculaire, après inoculation à un mammifère, à induire une production d'anticorps spécifiquement dirigé contre cette entité.

15 "Par polynucléotide" on entend soit une séquence d'ARN, soit une séquence d'ADN, soit une séquence d'ADNc résultant de la transcription inverse d'une séquence d'origine naturelle ou de synthèse, avec ou sans bases modifiées.

"Par voie muqueuse", on entend un mode d'administration qui met en contact directement la composition pharmaceutique avec les différents types de muqueuses de l'organisme.

20 "Par voie parentérale", on entend un mode d'administration qui met directement en contact la composition pharmaceutique avec les tissus ou organes interne de l'organisme.

25 L'invention vise donc tout peptide qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de l'enveloppe du HIV et qui est reconnu par un anticorps obtenu à partir d'un patient "long term non progressor" et spécifique de cet antigène. Un peptide selon l'invention peut être représenté avantageusement par l'une des 11 séquences telle que suit

30	SEQ ID NO : 1	Phe Asn Leu Thr His Phe Leu
	SEQ ID NO : 2	Glu Gly Trp His Ala His Thr
	SEQ ID NO : 3	Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr
	SEQ ID NO : 4	Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr
	SEQ ID NO : 5	Ala Met Pro Leu Pro Tyr Thr Phe
	SEQ ID NO : 6	Asp Ser His Thr Pro Gln Arg
35	SEQ ID NO : 7	Val Ser Phe Thr Pro Ser Phe

SEQ ID NO : 8 His Ala Ala Leu Ser Met Asn Thr His Ala Leu Met
SEQ ID NO : 9 Ala Trp His Glu Ser Arg Ala
SEQ ID NO : 10 Phe Lys Thr Ala Tyr Pro Thr
SEQ ID NO : 11 Ser His Ala Leu Pro Leu Thr Trp Ser Thr Ala Ala

5

A partir d'une banque combinatoire d'anticorps obtenue notamment à partir du sang périphérique d'un sujet ayant été infecté par le virus HIV et appartenant au groupe des "long-term non progressors", caractérisé en ce que ledit sujet appartenant à ce groupe est asymptomatique sur le plan clinique depuis au moins 10 ans et ne montre pas de signes biologiques d'immunosuppression avec notamment un taux de lymphocytes T CD4 supérieur à 600/mm³, et d'une librairie synthétique de peptides, on peut identifier, par le biais de mimotopes, de nouveaux épitopes conformationnels présents sur l'enveloppe du HIV, notamment des épitopes qui peuvent se situer en dehors de la boucle V3, comme par exemple des épitopes se situant dans la région du site de liaison au récepteur CD4, des épitopes chevauchant la boucle V2 et le site de liaison au récepteur CD4 ou même des épitopes chevauchant les régions C2, C3 et V4 de la Gp120 ou des épitopes se situant dans les régions non immunodominantes de la Gp 41 (clusters I et II). L'identification de ces mimotopes nécessite pour leur mise en œuvre un processus technologique sophistiqué, à savoir:

10

15

20

-la constitution d'une librairie combinatoire d'anticorps suffisamment complexe pour refléter au mieux le répertoire naturel en anticorps d'un individu, et de façon avantageuse le répertoire en anticorps d'un individu infecté par le HIV et appartenant au groupe des "long-term non progressors";

25

-la sélection au sein de cette banque, d'anticorps recombinants spécifiques d'antigènes de l'enveloppe du HIV, notamment exprimés par la Gp160, la Gp120, la Gp41 pouvant être sous forme de protéines naturelles ou recombinantes, glycosylées ou déglycosylées, monomériques ou multimériques ou enfin combinées entre elles ou non. La sélection des anticorps recombinants spécifiques comprend de façon préférentielle une étape supplémentaire consistant en la mesure de l'activité neutralisante de ces anticorps recombinants vis à vis de l'infection virale médiée notamment par un ou plusieurs isolats primaires du virus HIV. On retiendra de façon préférentielle les anticorps recombinants spécifiques et neutralisants de

30

35

plusieurs isolats primaires du virus HIV.

-la sélection de peptides spécifiques des anticorps recombinants, à partir d'une
bibliothèque synthétique aléatoire de peptides obtenue par recombinaison moléculaire, la
dite sélection pouvant se faire par ELISA ;

-la caractérisation de ces peptides comme étant des mimotopes d'épitopes
conformationnels du HIV en ce qu'il n'y a pas de correspondance entre la séquence
en acides aminés dudit peptide avec une quelconque séquence continue en acides
aminés retrouvée dans les protéines de l'enveloppe du HIV d'une part et d'autre
part en ce que ce peptide est capable d'inhiber l'interaction de l'anticorps
recombinant avec le produit du gène env qui a servi à la sélection dudit anticorps
recombinant.

On peut également procéder à la transformation des lymphocytes provenant
d'un patient "long term non progressor" en utilisant, par exemple le virus d'Epstein
Barr (EBV) pour la sélection de nouveaux anticorps monoclonaux spécifiques de
l'enveloppe du HIV. Le procédé de transformation lymphocytaire est bien connu de
l'homme de métier et aboutit, après plusieurs cycles de sélection contre l'antigène
d'intérêt à l'obtention des clones lymphocytaires transformés et immortels, chaque
clone produisant un seul type d'anticorps monoclonal. Ces anticorps monoclonaux,
comme les anticorps recombinants issus de la banque combinatoire peuvent être
également testés pour leur activité neutralisante contre différents isolats primaires
du HIV avant d'être utilisés pour la sélection de peptides mimotopes de l'enveloppe
du HIV.

Pour induire ou plutôt renforcer l'immunogénicité du peptide mimant un
épitope conformationnel du HIV, la présente invention a également pour objet des
peptides comprenant une répétition (2 ou plus) du peptide conforme à l'invention.
Notamment, l'accouplement des deux peptides identiques peut se faire au besoin
par le biais d'un bras espaceur intercalaire constituée par l'enchaînement en acides
aminés Gly Pro Gly.

L'invention concerne également une combinaison de différents peptides
conformes à l'invention, ainsi qu'à des peptides comprenant à la fois des répétitions
et des combinaisons.

Dans de tels cas, les peptides peuvent être joints par des liaisons covalentes ou des liaisons non covalentes. Par exemple, on peut citer avantageusement la méthode développée par Posnett et al (J. Biol. Chem. (1988) 263: 1719) qui n'altère pas la structure tridimensionnelle de l'épitope ou des épitopes porté par le peptide et aboutit à la formation de multimères du même peptide ou de peptides différents.

Dans le cadre notamment des préparations antigéniques et des formulations vaccinales qui sont décrites ci-après, on peut aussi préférer conjuguer par liaison covalente les peptides de l'invention à des molécules immunogènes usuellement utilisées pour rendre immunogène les peptides de petite taille.

Les peptides selon l'invention peuvent ainsi être conjugués aux protéines immunogènes connues telles que les sérum albumines, thyroglobuline, ovalbulmine, gélatine, haemocyanine (e.g. Keyhole Limpet Haemocyanin KLH), séroglobulines, anatoxine tétanique, anatoxine diphtérique, protéines de membranes externes de bactéries, etc, mais on peut aussi préférer conjuguer les peptides à des épitopes "T helper" parmi lesquels on choisit notamment les épitopes "T helper" du HIV , par exemple les épitopes T1 et p24E tels que décrits dans WO 94/29339 (Connaught). Les réactions de conjugaison avec lesdits épitopes "T helper" du HIV nous permettent d'obtenir des composés dont l'enchaînement séquentiel est p24E-GPG-X-GPG-T1 où:

-p24E symbolise la séquence d'acides aminés de l'épitope p24E, ladite séquence étant placée du côté N terminale du peptide selon l'invention;

-GPG symbolise l'enchaînement glycine-proline-glycine;

-X symbolise le peptide d'intérêt selon l'invention qui peut-être au besoin le produit de la combinaison de plusieurs séquences d'acides aminés identiques ou différentes conformes à l'invention;

-T1 symbolise la séquence d'acides aminés de l'épitope T1, ladite séquence étant placée du côté C terminale du peptide selon l'invention;

Parmi ces composés on peut citer les composés comprenant les séquences 12 à 14

SEQ ID NO : 12

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg
Phe Tyr Lys Gly Pro Gly Lys Leu Asn Trp Met Phe

Thr Gly Pro Gly Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr Gly
Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Glu
Lys Ala Met Tyr Ala

5 SEQ ID NO : 13 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg
Phe Tyr Lys Gly Pro Gly Ser Thr Asn Trp Met Phe
Thr Gly Pro Gly Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr Gly
Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Glu
Lys Ala Met Tyr Ala

10 SEQ ID NO : 14 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg
Phe Tyr Lys Gly Pro Gly Phe Asn Leu Thr His Phe
Leu Gly Pro Gly Phe Asn Leu Thr His Phe Leu Gly
Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Glu
15 Lys Ala Met Tyr Ala

20 Ces conjugués peuvent eux-mêmes être greffés sur une ossature
ramifiée de lysine de façon à obtenir des polymères desdits conjugués
sous une forme ramifiée telle que décrite dans WO 94/29339 (Connaught)
le contenu technique dudit brevet étant incorporé par référence dans l'objet
de l'invention.

25 Les techniques de conjugaison sont aussi parfaitement connues de
l'homme de l'art. On peut recourir par exemple aux agents
hétérobifonctionnels tels que SPDP, carbodiimide, glutaraldéhyde, système
biotine/avidine, etc.

30 On peut aussi coupler les peptides à des lipopolysaccharides,
polysaccharides, glycopeptides, analogues du muramyl peptide, acides gras,
etc. De préférence, on effectue le couplage d'un peptide avec un acide gras
du type palmitoyl-lysine tel que décrit dans EP 491628 (Biovector) ou (Pam)3
Cys-Ser tel que décrit dans EP547681 (Merck), par exemple, le contenu
technique desdits brevets étant incorporé par référence dans l'objet de
l'invention.

35 Les méthodes pour lier de manière opérationnelle des peptides

individuels par des chaînes latérales portant des résidus d'acide aminé, afin de former un conjugué immunogène, par exemple un polymère polypeptidique ramifié, sont aussi bien connues de l'homme de l'art. Par ces méthodes, on cherche à établir des liaisons sur différentes chaînes latérales par un ou plusieurs types de groupes fonctionnels afin d'obtenir une structure dans laquelle les structures peptidiques sont liées par covalence tout en étant séparées par au moins une chaîne latérale. Comme groupes fonctionnels, on peut citer les groupes aminés epsilon, les groupes bêta- ou gamma-carboxyliques, les groupes thiol (-SH) et les cycles aromatiques (par exemple tyrosine et histidine). Des méthodes pour lier des polypeptides à l'aide de ces groupes fonctionnels sont décrits dans Erlanger (1980 Method of Enzymology, 70 : 85), Aurameas et al., (1978 Scand. J. Immunol., Vol.8, suppl. 7, 7-23) et US-A-4 193 795. En outre, il est également possible de mettre en oeuvre une réaction de couplage dirigée telle que décrite dans Rodwell et al., (1985 Biotech 3, 889-894). Les peptides peuvent également être modifiés pour incorporer des bras d'espacement tels que hexaméthylène diamine ou d'autres molécules bi-fonctionnelles de tailles similaires.

Les peptides peuvent être également formulés avec de l'alum, du monophosphoryl Lipid A, pluronics, SAF1, Ribl, trehalose-6,6-dimycolate ou autres composés immunostimulants connus de l'homme de l'art pour accroître l'immunogénicité du peptide auquel ces composés sont liés.

Néanmoins toutes ces méthodes de conjugaison, de modification, de répétition ou de combinaison de peptides conformes à l'invention doivent respecter au mieux la conformation originelle du peptide.

La présente invention a aussi pour objet les fragments d'ADN codant pour les peptides selon l'invention et pouvant être utilisés pour produire les peptides par expression de la séquence d'ADN dans un système d'expression approprié. En tenant compte de la dégénérescence du code, l'homme de l'art est parfaitement à même de déterminer les différentes séquences d'ADN aptes à coder pour les différents peptides conformes à l'invention.

Selon un premier aspect de l'invention, le système d'expression est un système d'expression in vitro pour la production des peptides en vue de leur utilisation ultérieure, e.g. comme réactif de diagnostic, comme composant antigénique ou comme composant vaccinal. De tels systèmes ou vecteurs d'expression in vitro sont parfaitement connus de l'homme du métier et l'on peut citer à titre d'exemple les bactéries telles que *E. coli*, les cellules eucaryotes telles que les levures, notamment *S. cerevisiae*, le baculovirus, notamment propagé sur cellules d'insectes, etc.

L'invention a donc aussi pour objet une cassette d'expression comprenant un tel fragment d'ADN et des séquences régulatrices permettant l'expression de ce fragment d'ADN dans un système d'expression in vitro approprié.

Selon un deuxième aspect de l'invention le système d'expression est un système d'expression in vivo pour générer chez le patient traité une réaction immunitaire, de préférence protectrice. En d'autres termes, le système d'expression, qui peut être répliatif ou non répliatif, va exprimer le peptide in vivo. L'homme du métier a à sa disposition de tels systèmes. A titre d'exemples préférés, on peut citer les plasmides, notamment plasmides nus, e.g. selon WO-A-90 11092, WO-A-93 19813, WO-A-94 21797 et WO-A-95 20660, les poxvirus, tels que le virus de la vaccine et les pox aviaires (fowlpox, pigeonpox, canarypox, etc.), les adénovirus, etc.

L'invention a donc aussi pour objet des cassettes d'expression comprenant un tel fragment d'ADN et les moyens de régulation de l'expression dans le système d'expression choisi. Elle a aussi pour objet le système d'expression ou vecteur d'expression, comprenant une telle cassette d'expression, en particulier plasmide, poxvirus, adénovirus, comme vu ci-dessus.

L'invention enfin a pour objet l'utilisation des phages exprimant le peptide d'intérêt ou une combinaison de phages exprimant les peptides d'intérêt comme réactif de diagnostic, comme composant antigénique ou

vaccinal.

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'au moins un peptide conforme à l'invention en association ou non avec au moins un vecteur recombinant conforme à l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à guérir d'une affection liée au virus HIV. Une composition selon l'invention peut comprendre des préparations pouvant être sous forme de crèmes, de poudres lyophilisées ou non, de solutions, de suspensions, pour des administrations par voie muqueuse telle que oral, nasal, rectal, génital, cutanée, par exemple. Pour des administrations parentérales telle que intra dermique, sous cutanée, intra musculaire, intra veineuse, intra artériel, intra lymphatique ou intra péritonéale, par exemple, les préparations injectables stériles pourront être selon les cas sous forme de solutions, de suspensions ou d'émulsions. Outre le ou les principes actifs, conforme à l'objet de l'invention, les préparations pourront contenir des excipients et/ou des agents stabilisants adaptés au mode d'administration.

Les préparations destinées à un usage vaccinal pourront également contenir des adjuvants ou être incorporées dans des systèmes de délivrance compatibles avec un usage en médecine humaine. On peut rapporter notamment l'usage des adjuvants comme l'Alum (phosphate d'aluminium phosphate ou hydroxyde d'aluminium ou le mélange des deux) incorporé de façon classique dans les vaccins, l'adjuvant incomplet de Freund, le lipide A monophosphorylé (MPL), QS21, Polyphosphazène, muramyl dipeptide (MDP) ou ses dérivés, l'usage de système de délivrance de l'antigène comme les émulsions (MF59, SAF1, RIBI, SB 62, SB 26), les ISCOMS, les liposomes, les microsphères composées de polymères de PLGA de diamètre bien calibré, ou éventuellement les pseudo virions.

Les doses et voies d'administration de ces compositions pharmaceutiques seront déterminées en prenant en compte la nature de la composition, le niveau d'expression du peptide d'intérêt par le vecteur recombinant s'il est inclus dans la préparation, de l'âge, du sexe et du poids de l'individu recevant la préparation. Il sera également tenu compte de l'importance relative de la molécule porteuse dans le conjugué s'il est inclus

dans la composition .

Compte tenu de tous ces facteurs qui sont connus et appréciés par l'homme du métier, les doses de peptides administrées pourront atteindre 1 à 5 mg mais plus généralement se situeront entre 5µg et 1 mg par injection, de préférence 50 à 500µg. Le vecteur recombinant codant pour le peptide d'intérêt pourra être administré ou utilisé pour transfecter ou infecter les cellules d'intérêt à une dose minimale de $10^{3.5}$ unités infectantes (pfu ou plaque forming unit). De façon préférentielle, le vecteur recombinant sera utilisé dans une échelle de dose allant de 10^4 à 10^{10} pfu en fonction de l'efficacité d'expression du peptide par ce vecteur et notamment dans une échelle de dose allant de 10^6 à 10^9 pfu, par exemple. Lorsque la composition pharmaceutique comprend plusieurs vecteurs recombinants codant pour des peptides d'intérêt différents, il est bien entendu que ces mêmes échelles de doses pourront être appliquées à ces combinaisons. L'homme de l'art pourra se référer aux protocoles et essais cliniques utilisant des préparations à base de vecteurs recombinants, notamment les pox virus recombinants, les adenovirus recombinants, déjà réalisés chez l'homme pour convenir du nombre approprié de pfu que doit renfermer la composition pharmaceutique.

Lorsque la composition pharmaceutique comprend un plasmide contenant le système d'expression du peptide d'intérêt, il sera pris en compte dans le dosage de cette composition le niveau de réponse immune que cette composition est capable d'induire qui doit être au moins égale à celle du peptide intact ou modifié et/ou du niveau d'expression du peptide induit par le plasmide dans les cellules de l'organisme qui doit approcher le plus possible celui obtenu par les vecteurs recombinants déjà cités. Par exemple, les quantités de plasmides contenus dans les compositions pharmaceutiques pourront se situer dans des échelles allant de 1µg à 100mg, de façon préférentielle entre 0,1mg à 10mg . L'homme de l'art pourra se référer aux protocoles et essais cliniques déjà réalisés chez l'homme, utilisant des préparations d'ADN plasmidique pour convenir de la dose de plasmide que doit renfermer la composition pharmaceutique.

Pour la prévention de l'infection à HIV, la composition pharmaceutique pourra être administrée en une seule fois ou à plusieurs reprises pour atteindre le niveau de réponse désirée comprenant notamment le niveau et la qualité de la réponse anticorps spécifique et/ou à médiation cellulaire spécifique désirée, et caractérisée en ce qu'elle garantie la protection de l'individu vis à vis d'une contamination accidentelle. Pour atteindre cet objectif il pourra être nécessaire, outre la composition de la préparation, la voie d'administration choisie, de respecter les délais impartis entre chaque injection, qui peuvent être de façon préférentielle de 1 mois, 2 mois ou 6 mois et/ou de faire usage de façon combinée ou alternée pendant la durée du protocole médical, notamment vaccinal, de compositions pharmaceutiques différentes se rapportant au peptide, au vecteur recombinant, au plasmide d'intérêt ou même aux phages exprimant le ou les peptides d'intérêt que l'homme de l'art est capable de maîtriser. Il pourra être également nécessaire pour maintenir le niveau de protection de pratiquer des injections de rappel à intervalles réguliers.

Pour le traitement de l'infection liée au HIV, la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, pourra être administrée en une seule fois ou à plusieurs reprises et de façon pouvant être très rapprochées, notamment dans des délais inférieurs à une semaine, pour atteindre le niveau de réponse désirée, notamment celui qui permet de constater l'absence du virus HIV dans le sang par le test PCR. Au besoin, la composition pharmaceutique comprenant le peptide, le vecteur, le plasmide d'intérêt ou même aux phages exprimant le ou les peptides d'intérêt pourra être associé ou utilisé en alternance avec les traitements conventionnels de cette affection, comprenant notamment les mono, bi ou tri thérapie antivirale.

Que ce soit pour la prévention ou le traitement de l'infection à HIV il pourra être également utile de recourir à une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs peptides d'intérêt, le ou les vecteurs recombinants d'intérêt correspondants ainsi que le ou les plasmides d'intérêt ou même les bactériophages exprimant le ou les peptides d'intérêt pour stimuler les cellules du système immunitaire du patient in vitro ou ex vivo et

de les ré-injecter ensuite dans l'organisme de l'individu. Cette méthodologie a notamment été développée dans le traitement immunothérapeutique du cancer.

5 L'invention a pour objet enfin l'utilisation des peptides d'intérêt en tant que réactif pour le diagnostic de l'infection à HIV permettant notamment d'identifier les sujets plus résistants à l'infection encore appelés "Long term non progressor" ou à l'inverse d'identifier les sujets infectés plus susceptibles de développer un SIDA rapidement.. Pour la première fois des
10 nouveaux épitopes conformationnels de l'enveloppe du HIV ont été définis. On peut donc utiliser ces peptides, à des fins diagnostiques, pour rechercher préférentiellement des anticorps neutralisants d'isolats primaires du HIV, qui, très souvent reconnaissent des épitopes conformationnels et permettre ainsi de distinguer les individus "Long term non progressor" (
15 possédant des anticorps neutralisants) de ceux qui sont susceptibles d'évoluer rapidement vers un SIDA si aucun traitement, notamment anti-viral, n'est mis en place rapidement (ne possédant pas d'anticorps neutralisants).

La présente invention a donc aussi pour objet une méthode de
20 diagnostique de l'infection à HIV et/ou de susceptibilité des sujets infectés à développer un SIDA rapidement, la dite méthode étant basée préférentiellement sur l'analyse de la réponse humorale. Pour l'analyse de la réponse humorale on pourra utiliser des méthodes immunoenzymatiques, radioimmunologiques, ou de western blotting bien connues de l'homme du
25 métier, comme par exemple les méthodes ELISA, RIA, RIPA ou IRMA.

Description des figures

Les figures 1 à 5 représentent, en fonction de leur dilution, les courbes de
30 fixation des phages exprimant respectivement les séquences peptidiques SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 à un anticorps recombinant spécifique de la Ggp 160 et issu de la librairie combinatoire d'anticorps fabriqué à partir de lymphocytes d'un sujet "long term non progressor" (■) et à un anticorps IgG non spécifique d'antigène d'enveloppe du HIV (●), ces deux anticorps
35 étant préalablement fixés sur des plaques ELISA. L'intensité de la fixation est

proportionnelle à la valeur de la densité optique (D.O.) obtenue par ELISA.

La présente invention est décrite plus en détail ci après à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de sélection d'anticorps dirigés contre l'enveloppe du HIV, de sélection de peptides selon l'invention, de synthèse de peptides selon l'invention, d'induction d'anticorps spécifiques de peptides selon l'invention, de compositions vaccinales selon l'invention et d'utilisation de peptides selon l'invention pour le diagnostic de l'infection à HIV. Il va de soi, toutefois que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune matière une limitation.

Exemple 1: Sélection de peptides

La fabrication d'anticorps recombinants utilisant des méthodes de biologie moléculaire se sont largement développées depuis les dix dernières années et sont maintenant bien connues de l'homme du métier. Il est aussi connu que la spécificité d'un anticorps recombinant est portée essentiellement par les CDR3 des chaînes légères et lourdes. La connaissance de l'enchaînement en acides aminés qui représente le CDR3 et de la structure du squelette des chaînes lourdes et légères d'un anticorps donné est suffisante pour que l'homme de métier puisse reproduire et reconstituer un anticorps recombinant équivalent ayant les mêmes caractéristiques de reconnaissance dudit anticorps.

Les séquences codant pour les parties de chaînes lourdes et légère des molécules Fab sélectionnées peuvent être isolées et synthétisées, et clonées dans tout vecteur ou réplicon permettant leur expression.

Tout système d'expression approprié peut être utilisé, par exemple bactéries, levures, cellules d'insecte, d'amphibien et de mammifère. Les systèmes d'expression dans la bactérie incluent ceux décrits dans Chang et al. (1978) Nature 275 : 615, Goeddel et al. (1979) Nature 281 : 544, Goeddel et al. (1980) Nucleic Acids Res. 8 : 4057, EP-A-36,776, US-A-4,551,433, deBoer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 21-25, and Siebenlist et al. (1980) Cell 20 : 269. Les systèmes d'expression dans les levures incluent ceux décrit dans Hinnen et al. (1978) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 75 : 1929, Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153 : 163, Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6 : 142, Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25 : 141, Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132 : 3459, Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202 : 302, Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158 : 1165, De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154 : 737, Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8 : 135, Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25 : 141, Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5 : 3376, US-A- 4,837,148 et 4,929,555, Beach et al. (1981) Nature 300 : 706, Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10 : 380, Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10 : 49, Ballance et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 112 : 284-289, Tilburn et al. (1983) Gene 26 : 205-221, Yelton et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 1470-1474, Kelly et al. (1985) EMBO J. 4 : 475479 ; EP-A-244,234 et WO-A-91/00357.. L'expression de gènes hétérologues dans les insectes peut être réalisée comme décrit dans US-A-4,745,051, EP-A-127,839 et EP-A-155,476, Vlak et al. (1988) J. Gen. Virol. 69 : 765-776, Miller et al. (1988) Ann. Rev. Microbiol. 42 : 177, Carbonell et al. (1988) Gene 73 : 409, Maeda et al. (1985) Nature 315 : 592-594, Lebacqz-Verheyden et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8 : 3129, Smith et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 8404, Miyajima et al. (1987) Gene 58 : 273, et Martin et al. (1988) DNA 7 : 99.. De nombreux souches et variants de baculovirus et cellules d'insectes permissives sont décrits dans Luckow et al. (1988) Bio/Technology 6 : 47-55, Miller et al. (1986) GENERIC ENGINEERING , Setlow, J.K. et al. Eds. Vol. 8, Plenum Publishing, pp. 277-279, and Maeda et al. (1985) Nature 315 : 592-594.. L'expression en cellules de mammifère peut être réalisée comme décrit dans Dijkema et al. (1985) EMBO J. 4 : 761, Gorman et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 6777, Boshart et al. (1985) Cell 41 : 521, et US-A-4,399,216. On peut aussi se reporter à Ham et al. (1979) Meth. Enz. 58 : 44, Barnes et al. (1980) Anal. Biochem. 102 : 255, US-A-4,767,704, 4,657,866 ; 4,927,762 ; 4,560,655 ; brevet US RE 30,985, WO-A-90/103430 et WO-A-87/00195.

Les lymphocytes du sang périphérique provenant d'un sujet ayant été infecté par le virus HIV et appartenant au groupe des "long-term non progressors", sont utilisés pour produire la librairie combinatoire d'anticorps. L'ADNc des lymphocytes est obtenu à partir de l'ARN en utilisant une méthodologie développée par Sodoyer R. et al. (1997) Human Antibodies 8: 37. La librairie de chaines lourdes et légères est construite en utilisant les phagemides pVH (pM

831) et pVL (pM452). Les deux bibliothèques sont ensuite associées de façon "Random" par sous clonage des gènes VL dans la bibliothèque de chaînes lourdes. La bibliothèque de phagemides obtenue est ensuite infectée par le phage helper M13 VCS permettant ainsi l'expression des Fab à la surface des phages. Après
5 sélection des phages exprimant les Fab à leur surface par "panning" contre la protéine Gp 160, on détermine la séquence nucléotidique des Fab recombinants exprimés par les isolats positifs et notamment les séquences CDR3 portées par les fragments de chaînes lourdes et légères.

10 Un des anticorps recombinants spécifiques de la Gp 160 provenant de cette banque combinatoire est ensuite utilisé pour sélectionner les séquences peptidiques SEQ NO:1 à SEQ NO:11 à partir d'une banque de phages commercialement disponible exprimant des peptides de façon random (pHD7, NEB) en opérant de la façon suivante:

15 1,4 10^{11} phages sont incubés avec 30 ou 300ng de l'anticorps recombinant selon l'exemple 1 dans 200 μ l de PBS-0,1% tween 20 pendant 20 min à 20°C. Le mélange est transféré dans un tube contenant 50 μ l de protéine G couplée à des billes de sépharose préalablement équilibrées pendant 1 heure dans 1 ml de PBS-0,1% tween 20 contenant 5% de lait écrémé. Après une nouvelle incubation de 20
20 min, les billes sont centrifugées et lavées 3 fois par 1ml de PBS-0,1% tween 20. Au 4^{ème} lavage, les billes sont reprises par du PBS-0,1% tween 20 contenant 5% de lait écrémé, incubées 10 min, centrifugées et rincées à nouveau 3 fois par du PBS-0,1% tween 20. Après la dernière centrifugation les billes sont reprises dans 1 ml de glycine-HCl 0,2 M, pH=2,2, incubées 10min à 20°C et centrifugées. Le surnageant
25 est transféré dans un tube contenant 60 μ l de Tris base 2M pH=7,5, de façon à neutraliser la solution puis incubé avec 2 ml de bactéries E. Coli 7118 en phase exponentielle de croissance pendant 15 min. Le volume de la culture a été complété à 100 ml avec du milieu LB, et l'incubation a été poursuivie 4h à 37°C. Après une centrifugation destinée à éliminer les bactéries, les phages sont
30 précipités par addition de 25 ml de PEG 20%-NaCl 2,5M dans le surnageant de culture pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation (10 000 rpm, 20 mn, 4°C) le culot de phages est repris dans 1 ml de PBS-0,1% tween 20-1% lait écrémé, et titré. Le criblage est complet lorsque l'ensemble du processus a été répété 3 à 4
35 fois.

Pour compléter la sélection des phages exprimant les séquences peptidiques 1 à 11 on les a également testés par ELISA comme suit:

0,2 mg d'anticorps recombinant spécifique de la Gp 160 ou d'anticorps qui n'a pas de spécificité pour un antigène de l'enveloppe du HIV nommé "témoin Ig", dilués dans 50 µl de PBS, est déposé dans chaque puits d'une plaque ELISA suivi d'une incubation pendant 1 nuit à 4°C. Après remplacement de la solution d'anticorps par 0,1 ml de PBS-0.1% tween 20 (PBST) contenant 5 % de lait écrémé et incubation pendant 1h à 37°C, et réalisation d'une gamme de dilution de raison 2 sur les phages exprimant les séquences peptidiques, SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 en PBST-1% lait écrémé, les différentes dilutions réalisées sont distribués dans les puits sensibilisés soit par l'anticorps recombinant spécifique selon l'exemple 1, soit par le témoin Ig. Au bout de 2 h à 37°C, les phages sont retirés par aspiration des dilutions puis les puits lavés 10 fois avec 0,2 ml de PBST. Les puits sont ensuite incubés 1h à 37°C avec une solution au 1 :1000 en PBST-1% lait d'un anticorps biotinylé dirigé contre le phage fd (SIGMA). Après une nouvelle série de lavages en PBST-1% lait, un complexe streptavidine-peroxydase (SIGMA) dilué au 1 :2000 en PBST est ajouté dans chaque puits suivi par une incubation d' 1 h à température ambiante et de lavages en PBST-1% lait. L'activité enzymatique de la peroxydase est révélée, classiquement, par addition d'une solution d'OPD diluée à 1mg/ml en tampon citrate de sodium. L'intensité de coloration de la solution d'OPD est ensuite mesurée au spectrophotomètre, puis les courbes de D.O. (densité optique) sont établis en fonction de la dilution de phages. Les courbes des figures 1 à 5 montrent, à titre d'exemple, que les phages exprimant les séquences peptidiques, SEQ ID NO: 7 à SEQ ID NO: 11 se fixent bien sur l'anticorps recombinant spécifique (D.O. $\geq 0,6$ observée pour au moins une dilution de phages) tandis qu'il n'y a pas de fixation significative sur le témoin Ig (D.O. $\leq 0,3$ quelque soit la dilution de phages testée dans la gamme de dilution allant de $5 \cdot 10^{11}$ phages/puits à $4,8 \cdot 10^8$ phages/puits). Les phages positifs, c'est à dire ceux qui se fixent spécifiquement à l'anticorps recombinant spécifique sont amplifiés dans E. Coli . Des mini préparations d'ADN phagiques sont réalisées selon les procédures décrites dans les ouvrages de Maniatis , l'ADN est séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique à partir duquel on en déduit la séquence du peptide exprimé par le phage.

Exemple 2: Synthèse de peptides

Les peptides des SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11, sont synthétisés en phase solide en se référant aux méthodologies développées dans les ouvrages Solid phase peptide synthesis: a practical approach, IRL Press, Oxford, 1989 et Solid phase peptide synthesis, second edition, publié par Pierce Chemical Company, 1984.

La fonction α aminée des acides aminés est protégée par introduction d'un groupement t-butyloxycarbonyl (t-boc) permettant ainsi un accouplement par la fonction carboxylique de l'acide aminé à une résine chlorométhylée active. Après fixation sur la résine, la fonction amine est "déprotégée" par action de l'acide trifluoroacétique suivi d'une étape de neutralisation par la triéthylamine. La fonction amine ainsi libérée subit ensuite une réaction d'accouplement avec un autre acide aminé sous forme de dérivé t-boc par l'intermédiaire de carbodiimides. Ce procédé est mis en œuvre par l'automate ABI (Applied Biosystem Inc) 430A qui réalise ainsi la synthèse automatique de peptides. A la fin de la synthèse, le peptide est décroché de la résine par action de l'acide fluorhydrique. L'extrait est ensuite purifié par HPLC en phase réverse en utilisant une colonne semi préparative de type Vydac C4 et un gradient d'acétonitrile allant de 15 à 55% dans une solution d'acide trifluoroacétique à 0,1%. La chromatographie liquide est programmée pour une période de 40 min avec un débit de 2 ml/min. Le taux de pureté des peptides est contrôlé par chromatographie analytique et dépasse 95%.

Exemple 3: Induction d'anticorps spécifiques

1) Induction d'anticorps chez les cobayes et lapins

Les peptides des SEQ ID NO : 1 à 6, présentés sur des phages sont injectés à des cobayes et lapins : 2 injections de 100 microlitres par voie intraveineuse, à 3 semaines d'intervalle suivie d'une saignée finale 15 jours après la 2^{ème} injection. Les sérums sont testés en ELISA contre la gp160 et l'on observe une réaction contre la glycoprotéine. Ces peptides sont donc susceptibles d'induire une réponse contre la gp160.

2) Induction d'anticorps chez la souris

Les différents isolats de phages exprimant les peptides définis par les SEQ ID NO:7 à SEQ ID NO:11 sont purifiés sur gradient de chlorure de césium. On identifie ensuite 5 groupes de souris BaLB/c. Chaque groupe est immunisé par voie intrapéritonéale, 3 fois à 3 semaines d'intervalle avec un seul type d'isolat purifié exprimant soit la SEQ ID NO:7, soit la SEQ ID NO:8 soit la SEQ ID NO:9 soit la SEQ ID NO:10 soit la SEQ ID NO:11 à raison de 10^{12} phages purifiés par injection. Pour comparer les réponses anticorps, nous avons introduits 2 groupes de souris supplémentaires, le premier groupe recevant 3 injections de 10^{12} phages exprimant des peptides ne mimant pas d'épitopes conformationnels de l'enveloppe du HIV (phages irrélevants), le deuxième recevant 3 injections de 5 µg de protéine Gp160. Nous avons aussi introduit un 8^{ème} groupe de souris qui a reçu un mélange d'isolats de phages, comprenant à parties égales des phages exprimant les SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 et SEQ ID NO:11. Quelques souris de ce groupe ainsi que quelques souris du groupe immunisé avec les phages irrélevants ont reçu une 4^{ème} injection de 5 µg de Gp 160, 3 semaines après la 3^{ème} injection. L'analyse de la réponse anticorps spécifique est réalisé sur le sérum des souris de chaque groupe prélevés 15 jours après chaque injection. L'analyse de la réponse anticorps spécifique comprend la détection d'anticorps anti gp 160 par ELISA à l'aide de plaques sensibilisées avec la protéine Gp 160 en utilisant une procédure similaire à celle décrite dans l'exemple 1 et la recherche d'anticorps neutralisants. Pour la recherche d'anticorps neutralisants on détermine la dilution de sérum qui empêche la formation de syncytia dans 50% des micropuits infectés par 10 CCID₅₀ d'une souche de virus HIV. Après décomplémentation des sérums et réalisation d'une gamme de dilution de raison 2 en milieu RPMI, on mélange 500µl de la suspension de virus HIV titrant $10^{2.5}$ CCID₅₀/ml avec 500µl des différentes dilutions de serums. Après une incubation de 2 heures à 37°C, le mélange est déposé sous un volume de 100µl sur des cellules CEMss préalablement fixées dans des micropuits (6 micropuits /dilution de serum). Après 1 heure de contact à 37°C avec les cellules CEMss, le mélange est aspiré et remplacé par du milieu de culture. Après 7 et 14 jours d'incubation, les cultures sont examinées au microscope pour le dénombrement des syncytia. Le titre neutralisant de 50% est déterminé selon la

méthode de Spearman et Kärber. On observe une bonne production d'anticorps chez les souris du 8^{ème} groupe qui a été immunisée avec le mélange d'isolats de phages exprimant les différentes séquences peptidiques (SEQ ID NO:7 à SEQ ID NO:11)

5

Exemple 4: formulations vaccinales

10

15

20

Un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 ou obtenu à partir du produit d'expression d'un vecteur recombinant et notamment d'un baculovirus recombinant en utilisant les techniques développées par Smith et al (USA 4,745,051). Des émulsions eau dans huile sont ensuite préparées en utilisant le squalène comme constituant de la phase organique, le tween 80 ou un mélange de tween 80 et de SPAN comme surfactant, la phase aqueuse contenant la solution de peptide. Lorsque l'hydrophobicité du peptide est très importante, on procède à la réalisation d'émulsions huile dans eau dans lesquelles le peptide sera associé à la phase organique. Au besoin des immunostimulants comme le QS 21, des dérivés du MPL, ou tout autre adjuvant sont incorporés dans la préparation de ces émulsions. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 5: Formulations vaccinales

25

30

On prépare une formulation vaccinale à base de liposomes comprenant un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 en se référant aux ouvrages tels que " Liposomes as Drug Carriers " édité par G. Gregoriadis, 1988, ou aux volumes 1 à 3 de "Liposome Technology édité par G. Gregoriadis, 1984. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 6: Formulations vaccinales

35

On prépare une formulation vaccinale à base d'ISCOMs contenant un peptide ayant

l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 en se référant à B Morein et al , 1984, Nature 308:457 ou B Morein et al Immunology toDay, 1987, 8(11):333.

5

Exemple 7: Formulations vaccinales

10

15

20

25

30

On prépare une formulation à base de micro particules comprenant un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 mimant un épitope conformationnel de l'enveloppe du HIV. Pour la préparation de micro particules ou de nanoparticules, de nombreux polymères synthétiques ou naturels sont utilisés comme le polymère de methyl métacrylate (Troster S.D. et al, 1992, J. Micro-encaps. 9:19) mais souvent le poly (d, l-lactide- co-glycolide) encore appelé PLGA est le référent du fait de sa biodégradabilité, de son innocuité et de ses applications déjà ancienne dans le domaine médical. Les micro particules de PLGA chargées en peptides sont préparées notamment par double émulsion eau dans huile dans eau. Le peptide est solubilisé en phase aqueuse puis émulsionné dans une solution de PLGA en phase organique comme le dichlorométhane. L'émulsion eau dans huile est obtenue par agitation à haute vitesse de la solution de peptide dans la solution organique de PLGA. Puis une seconde phase aqueuse contenant une concentration appropriée de surfactant tel que l'alcool polyvinylique est ajoutée à la première émulsion pour réaliser ainsi la double émulsion. D'autres surfactants sont également utilisés comme les sels biliaires ou le poly (oxyéthylène glycerol monooleate) pour stabiliser la double émulsion (Rafati H et al., 1997, Vaccine 15: 1888). Après agitation pendant une nuit pour permettre l'évaporation du solvant , les micro particules de PLGA sont lavées plusieurs fois dans l'eau distillée puis lyophilisée et gardées à 5°C. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 8: Composition vaccinale

35

Les peptides qui comportent moins de 20 acides aminés peuvent être faiblement immunogéniques . Pour augmenter l' immunogénicité des peptides ayant l'une des

séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2, on prépare une formulation vaccinale à base de polymères du même peptide ou de peptides différents, sous forme d'octamères comprenant une structure poly-lysine ramifiée à 8 bras latéraux sur lesquels sont
5 fixés le même peptide ou des peptides différents selon l'exemple 1 en mettant en œuvre le procédé développé par Posnett D.N et al. (1988) J. Biol. Chem. 263 : 1719. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 9: Composition vaccinale

On réalise une composition vaccinale comprenant un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:4 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2, selon l'exemple 2 encadré par les 2 épitopes T helper P24E et T du virus HIV, ces 2 épitopes jouant le rôle de
20 molécule porteuse et renforçant ainsi l'immunogénicité du peptide. La réaction d'accouplement du peptide à ces 2 épitopes T helper se fait en 2 temps selon des procédés classiques bien connus de l'homme de métier. Dans un premier temps on réalise l'accouplement de la partie N terminale du peptide avec la partie C terminale de la séquence peptidique représentant l'épitope p24E en intercalant un
25 espacement constitué de la séquence glycine- proline- glycine. Puis dans un deuxième temps on réalise l'accouplement de la partie C terminale du produit intermédiaire avec la partie N terminale de la séquence peptidique représentant l'épitope T1 en intercalant la même séquence glycine- proline- glycine pour obtenir le produit final. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition
30 vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 10: Composition vaccinale comprenant un lipopeptide

On prépare une formulation vaccinale comprenant un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par
35

synthèse chimique selon l'exemple 2 couplé à une ou plusieurs chaînes dérivés d'acides gras parmi lesquels la N_ε palmitoyl-lysine, la N,N-dipalmitoyl-lysine, le pimélaute, le trimexaute ou à un groupement stéroïdien parmi lesquels le N_ε[(cholest-5-ényl-3-oxy)-acétyl]-lysine ou l'acide (cholest-5-ényl-3-oxy) acétique selon le procédé décrit dans le brevet EP0491628 (INSERM) de façon à obtenir un lipopeptide. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 11: Expression des peptides par des poxvirus

On prépare une composition vaccinale comprenant un poxvirus recombinant codant pour un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 mimant un épitope conformationnel de l'enveloppe du HIV. Les poxvirus recombinants sont obtenus par recombinaison homologue à partir de cellules embryonnaires de poulet infectées par les poxvirus et co-transfectées avec des plasmides contenant une cassette d'expression, flanquée aux extrémités de séquences d'ADN homologues à celles de régions non essentielles de l'ADN des poxvirus, et renfermant, sous la dépendance de promoteurs des poxvirus (H6, I3L), le poly nucléotide qui code pour le peptide selon l'exemple 2 en utilisant les procédés décrits dans les brevets US 4,769,330, 4,772,848, 4,603,112, 5,100,587, 5,179,993 et 5,863,542. On utilise ces poxvirus recombinants pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 12: Expression de plusieurs peptides par un poxvirus

On prépare une composition vaccinale comprenant un poxvirus recombinant codant pour plusieurs peptides ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 mimant plusieurs épitopes conformationnels de l'enveloppe du HIV. L'utilisation et la préparation de vecteurs recombinants codant pour plusieurs épitopes est bien connu de l'homme de métier (Toes RE et al.

(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 14660 , Thomson SA et al. (1996) J. Immunol. 157: 822) et est applicable aussi à la préparation de poxvirus recombinants codant pour des mimotopes multiples . On prépare notamment une composition vaccinale comprenant un canaripox recombinant (ALVAC recombinant) codant pour des mimotopes multiples de l'enveloppe du HIV. On utilise ces poxvirus recombinants pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 13: Combinaisons de peptides

On prépare une composition vaccinale comprenant plusieurs peptides ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 en utilisant les différents modes de préparation décrits dans les exemples 2 à 12 mimant plusieurs épitopes conformationnels de l'enveloppe du HIV. On utilise ces différentes compositions pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 13: Diagnostic

On met en œuvre une détection d'anticorps spécifiques du HIV par ELISA en utilisant un ou plusieurs peptides ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 pour le diagnostic de l'infection à HIV à partir d'un échantillon biologique. De manière générale, on prélève un échantillon de fluide physiologique (sang, plasma, sérum), échantillon que l'on fait ensuite réagir en présence d'un peptide selon l'invention.

Pour ce faire, on utilise le peptide lui-même comme réactif de diagnostic. On recourt généralement

-soit à un test de diagnostic indirect, de type ELISA dans lequel le peptide fixé sur un support (puits) est mis en présence de l'échantillon à tester, tandis que la

révélation de la fixation antigène-anticorps est assurée par un anti-Ig marqué.

-soit à un test par compétition ou de déplacement, dans lequel on utilise un peptide selon l'invention, et un anticorps marqué spécifique du peptide. Le peptide est là aussi fixé à un support solide tel que puits, bandelettes. Dans le test de

compétition, on met le peptide simultanément en présence de l'échantillon (anticorps de l'échantillon) et d'un anticorps marqué spécifique du peptide.

Les anticorps marqués à la peroxydase sont généralement utilisés.

Dans le test de compétition ou de déplacement on utilise généralement des anticorps monoclonaux et polyclonaux ou anticorps recombinants spécifiques du peptide selon l'invention, qui sont parfois des fragments Fab ou F(ab)₂ et en particulier ceux décrits dans l'invention.

Exemple 14: Diagnostic

On met en œuvre une détection d'anticorps spécifiques du HIV par immunochromatographie en utilisant un ou plusieurs peptides selon l'invention pour le diagnostic de l'infection à HIV à partir d'un échantillon biologique

Dans ce cas le peptide selon l'invention est fixé sur un support de type bandelette et on se réfère à l'article de Robert F.N Zurk et al., Clin. Chem. 31/7, 1144-1150 (1985) ainsi qu'aux brevets ou demandes de brevet WO-A-88/08 534, WO-A-91/12528, EP-A-291 176, EP-A-299 428, EP-A-291 194, EP-A-284 232, US-A-5 120 643, US-A-5 030 558, US-A-5 266 497, US-A-4 740 468, US-A-5 266 497, US-A-4 855 240, US-A-5 451 504, US-A-5 141 850, US-A-5 232 835 et US-A-5 238 652 pour mettre en œuvre le procédé.

Exemple 15 : Diagnostic

Etude de la réponse lymphoproliférative spécifique à un ou plusieurs peptides selon l'invention pour le diagnostic de l'infection à virus HIV à partir d'un échantillon biologique.

Le sang du patient est recueilli sur tube hépariné . Les lymphocytes sont ensuite séparés par centrifugation sur Ficoll hypaque puis distribués en microplaques 96 puits stériles à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits à fond rond sous un volume final de 200µl de milieu de culture complet (RPMI 1640 supplémenté par 25mM HEPES, 2mM L-glutamine , 50U/ml de pénicilline, 50µg/ml de streptomycine et 5% de sérum

AB décomplementé) et mis en présence de concentrations variables d' un ou plusieurs peptides ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 (concentrations allant de 1ng/ml à 50µg/ml). Chaque concentration de peptide est
5 testé en triplicatte pour s'affranchir au mieux des variations biologiques. Des combinaisons multiples de peptides peuvent être également testés dans la gamme de concentration indiquée, par exemple une combinaison résultant de l'association d'un mimotope de l'enveloppe avec un mimotope de la nucléocapside dans la gamme de concentration indiquée. Après 5 jours de culture à 37 °c sous 5% CO2,
10 0,5µci de thymidine tritiée est ajouté à chaque puits. Après une nouvelle incubation de 16 heures, on recueille l'ADN cellulaire de chaque puits de culture sur des filtres après précipitation à l'éthanol et on mesure le taux d'incorporation de thymidine tritiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide qui reflète l'intensité de la réponse lymphoproliférative. Les résultats sont exprimés sous la forme d'index de stimulation
15 (moyenne des cpm des puits de culture lymphocytaire contenant une concentration donné en peptide/ moyenne des cpm des puits de culture lymphocytaire sans peptide). La réponse lymphoproliférative est considérée comme positive lorsque l'index de stimulation est supérieur à 3.

20

25

Revendications

- 1) Peptide pour la prévention ou le traitement thérapeutique de l'infection à virus HIV capable d'interagir avec un anticorps spécifique d'un antigène de l'enveloppe dudit virus et provenant d'un patient HIV positif et appartenant au groupe des "long term non progressor" , comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de ladite enveloppe sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène.
- 2) Peptide selon la revendication 1, selon laquelle l'antigène de l'enveloppe est représenté par la protéine d'enveloppe gp160.
- 3) Peptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ce peptide peut comprendre les séquences 1 à 11
- | | |
|----------------|---|
| SEQ ID NO : 1 | Phe Asn Leu Thr His Phe Leu |
| SEQ ID NO : 2 | Glu Gly Trp His Ala His Thr |
| SEQ ID NO : 3 | Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr |
| SEQ ID NO : 4 | Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr |
| SEQ ID NO : 5 | Ala Met Pro Leu Pro Tyr Thr Phe |
| SEQ ID NO : 6 | Asp Ser His Thr Pro Gln Arg |
| SEQ ID NO : 7 | Val Ser Phe Thr Pro Ser Phe |
| SEQ ID NO : 8 | His Ala Ala Leu Ser Met Asn Thr His Ala Leu Met |
| SEQ ID NO : 9 | Ala Trp His Glu Ser Arg Ala |
| SEQ ID NO : 10 | Phe Lys Thr Ala Tyr Pro Thr |
| SEQ ID NO : 11 | Ser His Ala Leu Pro Leu Thr Trp Ser Thr Ala Ala |
- 4) Peptide comprenant l'enchaînement d'au moins deux peptides selon l'une des revendications 1 à 3.
- 5) Peptide selon la revendication 4 comprenant la duplication de peptides identiques.
- 6) Peptide selon la revendication 5 dans laquelle l'accouplement des deux peptides se fait au moyen d'un bras "espaceur" constitué de la séquence en acides aminés Gly Pro Gly

7) Conjugué comprenant au moins un peptide selon l'une des revendications 1 à 6 lié à une molécule porteuse pour induire ou renforcer l'immunogénicité dudit peptide.

5 8) Conjugué selon la revendication 7 selon laquelle la molécule porteuse comprend au moins un épitope T helper du virus HIV.

9) Conjugué selon la revendication 8 dont la molécule porteuse comprend l'épitope p24E et T1 du virus HIV

10

10) Conjugué selon la revendication 9, comprenant un peptide résultant de la duplication des séquences NO:1, NO:3 ou NO:4 selon la revendication 6, ledit peptide étant lié du côté N terminal à l'épitope p24E et du côté C terminal à l'épitope T1 par l'intermédiaire de 2 bras "espaceurs".

15

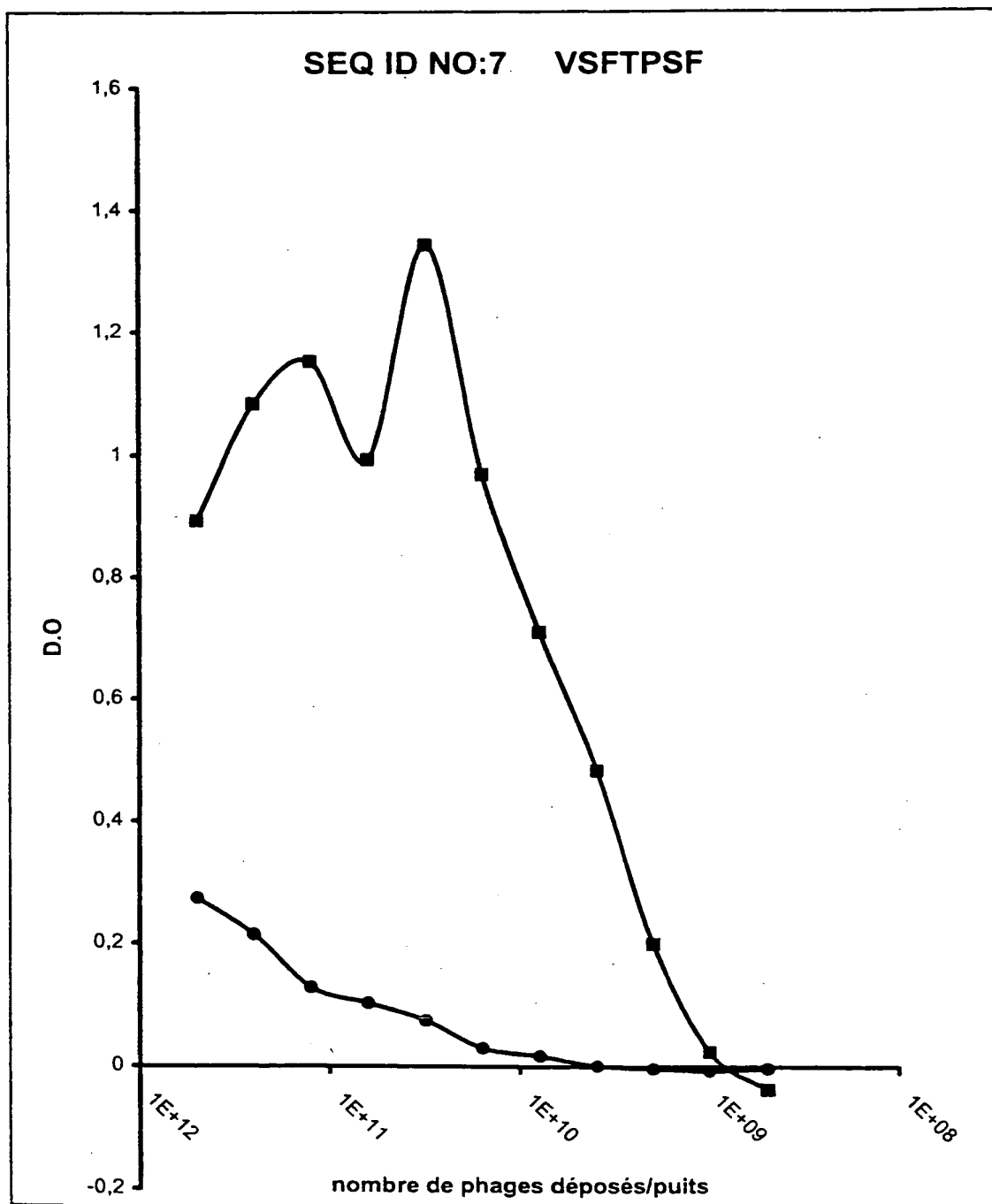
11) Conjugué selon la revendication 10, caractérisé en ce que les 2 bras espaceurs sont identiques et sont constitués de l'enchaînement Gly Pro Gly et qu'il comprend au choix l'une des séquences 12 à 14

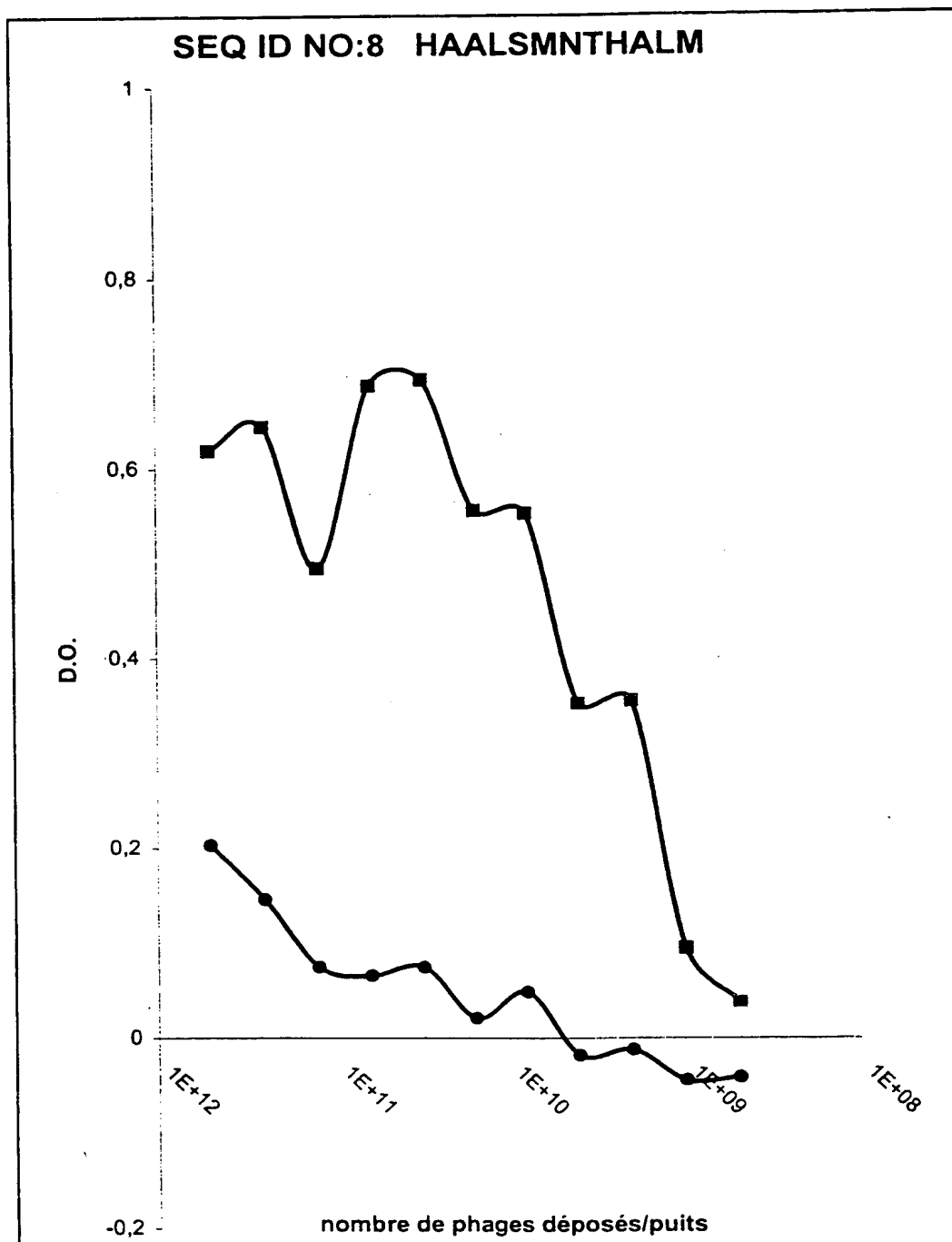
SEQ ID NO : 12 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys
20 Gly Pro Gly Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly Lys Leu Asn
Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
Glu Lys Ala Met Tyr Ala

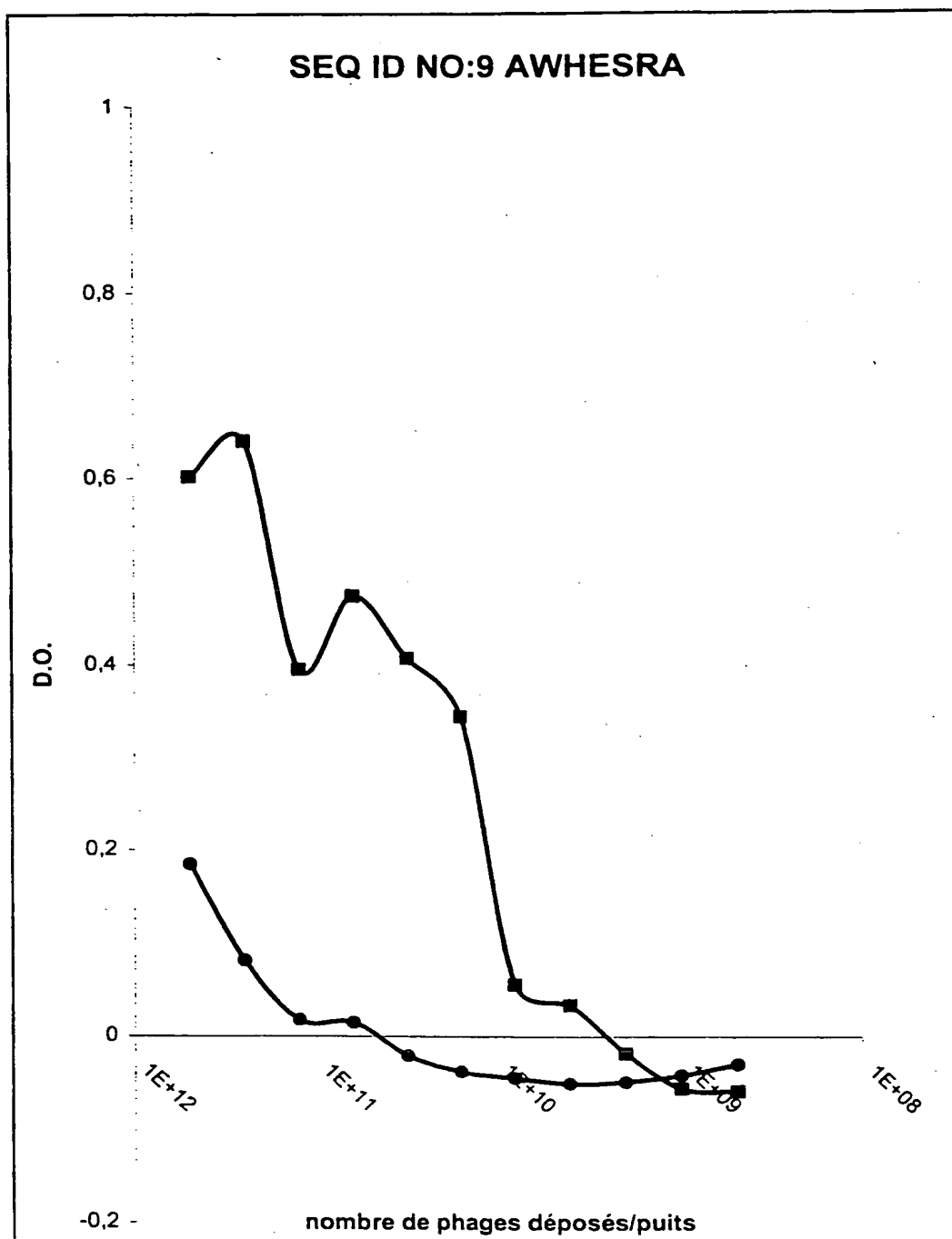
SEQ ID NO : 13 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Gly
25 Pro Gly Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly Ser Thr Asn
Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
Glu Lys Ala Met Tyr Ala

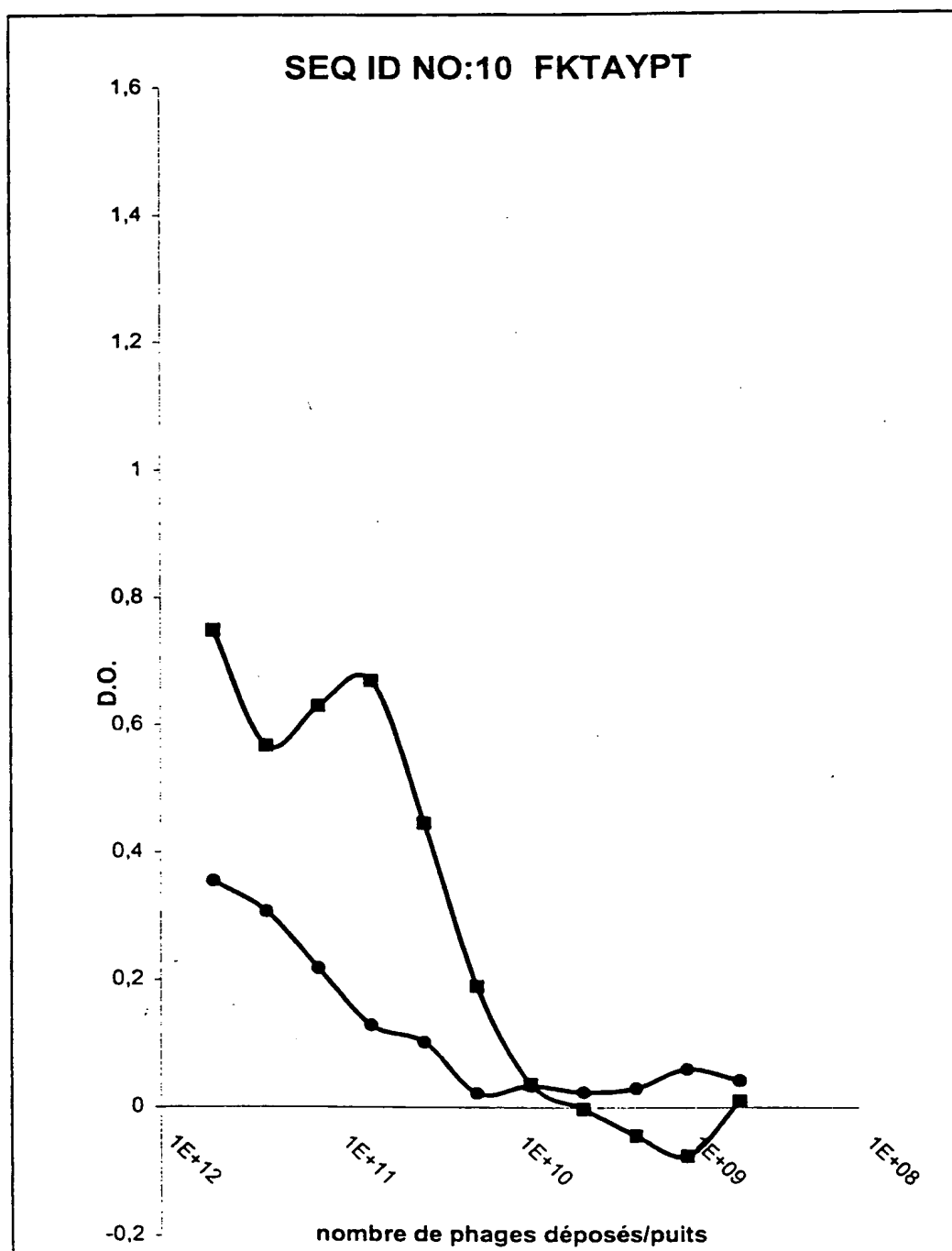
SEQ ID NO : 14 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Gly
30 Pro Gly Phe Asn Leu Thr His Phe Leu Gly Pro Gly Phe Asn Leu
Thr His Phe Leu Gly Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu
Val Glu Lys Ala Met Tyr Ala

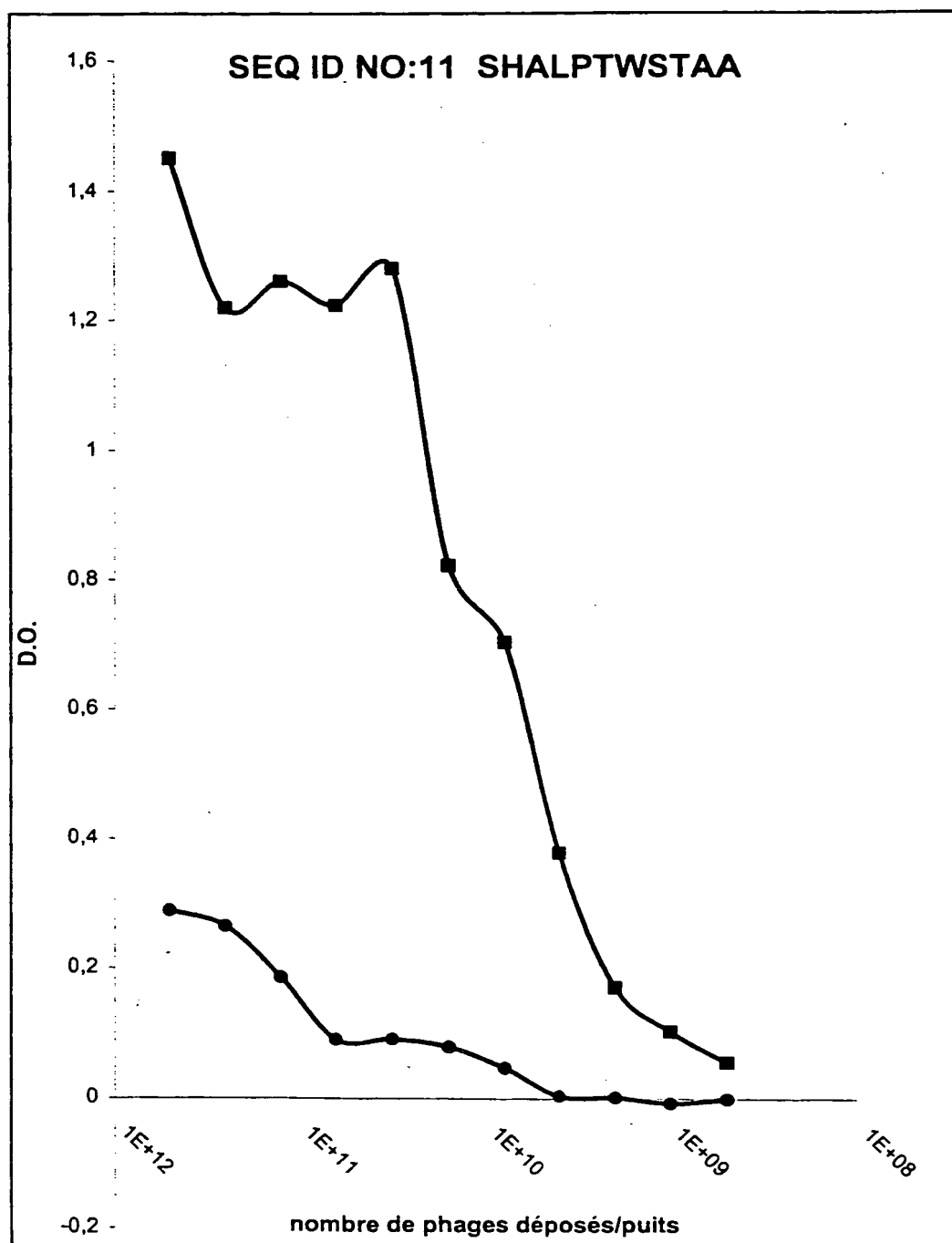
- 12) Vecteur recombinant comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un poly nucléotide codant pour un peptide selon l'une des revendications 1 à 11
- 5 13) Vecteur recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est un adénovirus, un poxvirus, un baculovirus, un bactériophage ou un plasmide.
- 10 14) Composition thérapeutique ou prophylactique pour l'infection à HIV, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe actif comprend un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide selon l'une des revendications 12 et 13.
- 15 15) Composition selon la revendication 14 dont le principe actif est sous la forme d'une formulation associée à un adjuvant compatible pour l'administration d'une dose efficace par voie muqueuse ou parentérale.
- 20 16) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 12 et 13 en tant que réactif pour le diagnostic du HIV, ledit diagnostic comprenant l'évaluation, à partir d'un échantillon de sang, de la réponse humorale et/ou à médiation cellulaire spécifique de ce peptide.
- 25 17) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 12 et 13 en tant que réactif pour le diagnostic de la susceptibilité de sujets infectés par le virus HIV, à développer rapidement un SIDA.
- 30 18) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 12 et 13 pour la préparation d'une composition thérapeutique ou prophylactique, destinée au traitement ou à la prévention de l'infection à HIV.
- 35 19) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 12 et 13 pour stimuler *in vitro* les cellules du système immunitaire d'un individu, les dites cellules étant ensuite destinées à être réinjectées dans l'organisme de l'individu après stimulation.











LISTE DE SEQUENCES

<110> Pasteur Mérieux Serum et Vaccins
Gros, Florent

<120> Mimotopes du HIV

<130> PM9804

<140>

<141>

<150> FR 9807598

<151> 1998-06-12

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Mimotope peptidique du HIV

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV

<400> 1

Phe Asn Leu Thr His Phe Leu

1

5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
HIV

<400> 2

Glu Gly Trp His Ala His Thr

1

5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
HIV

<400> 3

Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr

1

5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 4
Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 5
Ala Met Pro Leu Pro Tyr Thr Phe
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 6
Asp Ser His Thr Pro Gln Arg
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 7
Val Ser Phe Thr Pro Ser Phe
1 5

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 8
His Ala Ala Leu Ser Met Asn Thr His Ala Leu Met
1 5 10

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 9
 Ala Trp His Glu Ser Arg Ala
 1 5

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 10
 Phe Lys Thr Ala Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 11
 Ser His Ala Leu Pro Leu Thr Trp Ser Thr Ala Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 12
 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Gly
 1 5 10 15
 Pro Gly Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly Lys Leu Asn Trp
 20 25 30
 Met Phe Thr Gly Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 35 40 45
 Glu Lys Ala Met Tyr Ala
 50

<210> 13
 <211> 54
 <212> PRT
 <<213> Séquence artificiell
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 13
 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Gly
 1 5 10 15
 Pro Gly Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly Ser Thr Asn Trp
 20 25 30
 Met Phe Thr Gly Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 35 40 45
 Glu Lys Ala Met Tyr Ala
 50

<210> 14
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 14
 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Gly
 1 5 10 15
 Pro Gly Phe Asn Leu Thr His Phe Leu Gly Pro Gly Phe Asn Leu Thr
 20 25 30
 His Phe Leu Gly Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 35 40 45
 Glu Lys Ala Met Tyr Ala
 50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01409

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/49 C07K14/16 A61K39/21 C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 29339 A (CONNAUGHT LAB ;SIA CHARLES D Y (CA); CHONG PELE (CA); KLEIN MICHEL) 22 December 1994 (1994-12-22) claims; examples ----	1-11
A	WO 95 12677 A (DELEYS ROBERT ;INNOGENETICS NV (BE); MAERTENS GEERT (BE); LEROUX R) 11 May 1995 (1995-05-11) page 25, paragraph 3 ----	1-11
A	WO 97 18236 A (UNIV NEW YORK) 22 May 1997 (1997-05-22) claims; examples ----	1-3
A	EP 0 800 084 A (IMMUNO GMBH) 8 October 1997 (1997-10-08) page 4, line 4 - line 12; claims; examples ----- -/--	1-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 1999

Date of mailing of the international search report

05/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01409

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	US 5 830 634 A (BRUST STEFAN ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) column 8, line 13 - line 16; claims; examples -----	1-11
P, X	WO 99/12558 A (FERTALA ANDRZEJ ; ALLEGHENY UNIVERSITY OF THE HE (US); PROCKOP DARW) 18 March 1999 (1999-03-18) see Seq ID 17 claim 4 -----	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429339 A	22-12-1994	AU 693098 B	25-06-1998
		AU 6967394 A	03-01-1995
		BR 9406821 A	26-03-1996
		CN 1128538 A	07-08-1996
		EP 0702693 A	27-03-1996
		JP 8511007 T	19-11-1996
		US 5639854 A	17-06-1997
		US 5759769 A	02-06-1998
		US 5876731 A	02-03-1999
		US 5795955 A	18-08-1998
		US 5817754 A	06-10-1998
		US 5800822 A	01-09-1998
WO 9512677 A	11-05-1995	AU 698878 B	12-11-1998
		AU 7993294 A	23-05-1995
		CA 2175692 A	11-05-1995
		EP 0725824 A	14-08-1996
WO 9718236 A	22-05-1997	US 5877155 A	02-03-1999
		CN 1202175 A	16-12-1998
		EP 0876396 A	11-11-1998
EP 0800084 A	08-10-1997	DE 19613253 A	09-10-1997
US 5830634 A	03-11-1998	DE 4405810 A	24-08-1995
		AT 173275 T	15-11-1998
		AU 697121 B	24-09-1998
		AU 1353295 A	07-09-1995
		BR 9500732 A	24-10-1995
		CA 2143163 A	24-08-1995
		DE 59504181 D	17-12-1998
		EP 0673948 A	27-09-1995
		ES 2124922 T	16-02-1999
		JP 7278189 A	24-10-1995
		NO 950668 A	24-08-1995
WO 9912558 A	18-03-1999	AU 9312598 A	29-03-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar 'internationale No

PCT/FR 99/01409

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/49 C07K14/16 A61K39/21 C12N15/63

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 29339 A (CONNAUGHT LAB ; SIA CHARLES D Y (CA); CHONG PELE (CA); KLEIN MICHEL) 22 décembre 1994 (1994-12-22) revendications; exemples	1-11
A	WO 95 12677 A (DELEYS ROBERT ; INNOGENETICS NV (BE); MAERTENS GEERT (BE); LEROUX R) 11 mai 1995 (1995-05-11) page 25, alinéa 3	1-11
A	WO 97 18236 A (UNIV NEW YORK) 22 mai 1997 (1997-05-22) revendications; exemples	1-3
A	EP 0 800 084 A (IMMUNO GMBH) 8 octobre 1997 (1997-10-08) page 4, ligne 4 - ligne 12; revendications; exemples	1-11
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/10/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar Internationale No

PCT/FR 99/01409

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	US 5 830 634 A (BRUST STEFAN ET AL) 3 novembre 1998 (1998-11-03) colonne 8, ligne 13 - ligne 16; revendications: exemples ----	1-11
P,X	WO 99 12558 A (FERTALA ANDRZEJ ; ALLEGHENY UNIVERSITY OF THE HE (US); PROCKOP DARW) 18 mars 1999 (1999-03-18) see Seq ID 17 revendication 4 -----	1-3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demar internationale No

PCT/FR 99/01409

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9429339 A	22-12-1994	AU 693098 B	25-06-1998
		AU 6967394 A	03-01-1995
		BR 9406821 A	26-03-1996
		CN 1128538 A	07-08-1996
		EP 0702693 A	27-03-1996
		JP 8511007 T	19-11-1996
		US 5639854 A	17-06-1997
		US 5759769 A	02-06-1998
		US 5876731 A	02-03-1999
		US 5795955 A	18-08-1998
		US 5817754 A	06-10-1998
		US 5800822 A	01-09-1998
WO 9512677 A	11-05-1995	AU 698878 B	12-11-1998
		AU 7993294 A	23-05-1995
		CA 2175692 A	11-05-1995
		EP 0725824 A	14-08-1996
WO 9718236 A	22-05-1997	US 5877155 A	02-03-1999
		CN 1202175 A	16-12-1998
		EP 0876396 A	11-11-1998
EP 0800084 A	08-10-1997	DE 19613253 A	09-10-1997
US 5830634 A	03-11-1998	DE 4405810 A	24-08-1995
		AT 173275 T	15-11-1998
		AU 697121 B	24-09-1998
		AU 1353295 A	07-09-1995
		BR 9500732 A	24-10-1995
		CA 2143163 A	24-08-1995
		DE 59504181 D	17-12-1998
		EP 0673948 A	27-09-1995
		ES 2124922 T	16-02-1999
		JP 7278189 A	24-10-1995
		NO 950668 A	24-08-1995
WO 9912558 A	18-03-1999	AU 9312598 A	29-03-1999